

10/009501

**MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO**  
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

4



REC'D 02 OCT 2000  
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per INV. IND.

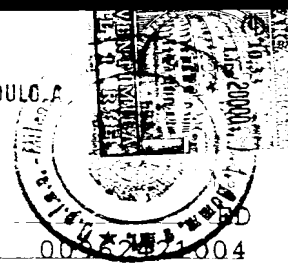
N. MI99 A 001299

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali  
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati  
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

a, li

28 GIU. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE  
IL DIRIGENTE  
*Dr. Marcus G. Conte*



## A. RICHIEDENTE (I)

1. Denominazione CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHEResidenza RomaCodice 001852471004

2. Denominazione

Residenza

Codice

## B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri

Cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.via Rossinin° 8città Milanocap 20122iprov. MI

## C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n°

città

cap

iprov.

## D. TITOLO

classe proposta (sezione di sci)

C12N

gruppo/sottogruppo

15/00"Uso di anticorpi contro antigeni di superficie per il trattamento della malattia trapianto contro ospite"

## ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐NO ☒

SE ISTANZA DATA

N° PROTOCOLLO

## E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Golay Josee3) Rambaldi Alessandro2) Introna Martino4) Biondi Andrea

## F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato  
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

2)

## G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione:

## H. ANNOTAZIONI SPECIALI



## DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N° es

Doc 1) 2 ☐ PROV n° pag 17Doc 2) 2 ☐ PROV n° tav 03Doc 3) 0 ☒ XSDoc 4) 0 ☐ RISDoc 5) 0 ☐ RISDoc 6) 0 ☐ RISDoc 7) 0

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, prot. di deposito, prot. di deposito generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

8) attestati di versamento, totale lire

Trecentosessantacinquemila#

obbligatorio

COMPILATO IL 11/06/1999

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Minoja FabrizioCONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANOcodice 15

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI99A 001299

Reg. A

L'anno millenovecento

NOVANTANOVE

il giorno

UNDICI

del mese di

GIUGNO

il/i richiedente/i sopraindicato/i ha/hanno presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata di n°

00

fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato

## I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

Bipin Micheli

IL DEPOSITANTE

timbro  
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

M199A00129

1406/1999

## A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

## D. TITOLO

"Uso di anticorpi contro antigeni di superficie per il trattamento della malattia trapianto contro ospite"

Classe proposta (sez./cl./scl.)

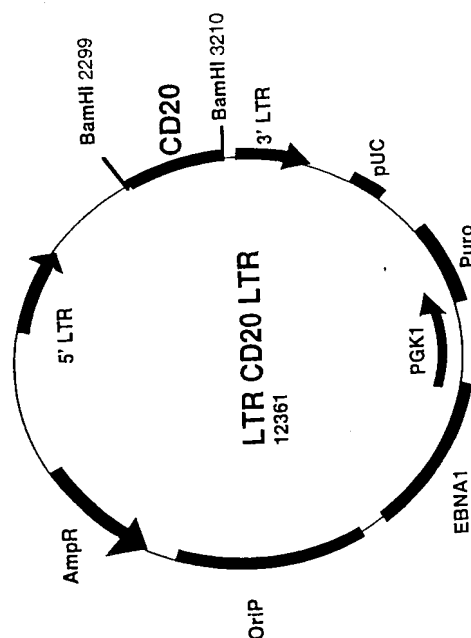
(gruppo/sottogruppo)

## L. RIASSUNTO

Si descrive l'uso di anticorpi contro antigeni di superficie esogeni non presenti su linfociti T umani normali per la preparazione di composizioni per il trattamento della malattia trapianto contro ospite in pazienti che abbiano ricevuto linfociti T trasdotti con detti antigeni di superficie esogeni.

## M. DISEGNO

FIGURA 1



5802 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

FM as "USO DI ANTICORPI CONTRO ANTIGENI DI SUPERFICIE PER IL  
TRATTAMENTO DELLA MALATTIA TRAPIANTO CONTRO  
OSPITE"

11 GIU. 1999

a nome : CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE

con sede in: Roma

\* \*

MI 99 A 001299

La presente invenzione ha per oggetto l'uso di anticorpi contro antigeni di superficie esogeni non presenti su linfociti T umani normali per la preparazione di composizioni per il trattamento della malattia trapianto contro ospite in pazienti che abbiano ricevuto linfociti T trasdotti con detti antigeni di superficie esogeni.

L'invenzione riguarda inoltre vettori per la trasfezione di linfociti T umani con antigeni di superficie esogeni e linfociti T umani trasdotti con antigeni di superficie esogeni.

#### STATO DELLA TECNICA

Il problema delle ricadute cliniche in pazienti con malattie ematologiche (leucemie e linfomi) assume dimensioni sempre più importanti. Da molti anni è ormai stato definito un preciso ruolo terapeutico alle procedure trapiantologiche di midollo o di precursori circolanti purificati (J. O. Armistage, Bone marrow transplantation, New England Journal of Medicine, 1994, 330, 827-838). L'efficacia clinica di queste procedure si basa in parte su un meccanismo di riconoscimento immunologico delle cellule leucemiche dell'ospite da parte dei linfociti T del donatore (GVL = Graft Versus Leukemia) (M. Sykes, FASEB J., 10, 721-730, 1996). Tuttavia i trapianti sono gra-

vati da molti effetti tossici tra i quali è preponderante la reattività immunologica degli stessi linfociti del donatore nei confronti dei tessuti sani del ricevente (GVDH = Graft Versus Host Disease). In altri termini la somministrazione di linfociti T all'ospite presenta chiari benefici associati a gravi rischi e non si riesce a separare farmacologicamente questi due aspetti.

Ancorché tecniche di immunoselezione standardizzate consentano oggi facilmente di produrre grandi quantità di linfociti T purificati del donatore così da poterli somministrare al fine di indurre in vivo un effetto GVL, non sono ancora generalmente disponibili tecniche adeguate per indurre farmacologicamente la morte selettiva dei linfociti T somministrati a un paziente così da eliminare l'effetto GVHD al momento in cui clinicamente questo fosse necessario.

Nel corso degli anni molti anticorpi mono e policlonali sono stati prodotti contro molecole di superficie umane; in molti casi anticorpi sono stati prodotti con il preciso scopo di uccidere in vivo una cellula positiva per quella determinata molecola così da poter essere utilizzati in protocolli di immunoterapia; limitatamente al settore dei linfomi di tipo B, ad esempio, sono stati prodotti e caratterizzati anticorpi efficaci contro le molecole CD20, CD19, CD40, CD22, CD52, CD38 e altri ancora (P. S. Multani et al., J. Clin. Oncol., 16, 3691-3710, 1998). In alcuni casi gli anticorpi diretti contro queste molecole si sono dimostrati citotossici in vivo probabilmente perché in grado di attivare la cascata complementare sulla superficie della cellula bersaglio, come per il CD20, il CD38 e il CD52. In altri casi agli anticorpi sono stati coniugati atomi radioattivi così da indurre la radiolisi del bersaglio come per il CD20, il Lym-1 e altri ancora. Altri anticorpi sono stati coniugati a tossine

di origine vegetale o batterica sempre con la stessa qualità come nel caso del CD19, del CD40 e del CD22. Altri anticorpi sono stati chimerizzati per fornire una bispecificità così da, per esempio, portare due cellule a contatto tra loro, etc.. Infine, per molti di questi anticorpi vi sono versioni ingegnerizzate e/o umanizzate così da poterli somministrare in vivo riducendo il rischio della antigenicità e aumentandone l'efficacia.

#### DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che è possibile controllare efficacemente il problema della malattia trapianto contro ospite utilizzando un metodo che prevede l'inserimento di un antigene di superficie esogeno nei linfociti T del donatore e la successiva somministrazione al paziente ricevente gli anticorpi diretti contro detto antigene esogeno.

Per antigene esogeno si intende un qualunque antigene di superficie non presente sui linfociti T normali, ad esempio gli antigeni espressi sulla superficie di linfociti B quali gli antigeni CD 20, CD19, CD40, CD22, CD52 etc. Ovviamente, si sceglierà un antigene di superficie tale da non provocare, in seguito alla reazione con l'anticorpo corrispondente, effetti negativi o indesiderati a livello delle popolazioni cellulari che esprimono costitutivamente l'antigene stesso.

E' particolarmente preferito l'antigene di superficie di linfociti B umani CD 20 per il quale è disponibile in commercio un anticorpo monoclonale umanizzato (Rituximab R, Roche) che viene usato in terapia nel trattamento di linfomi non Hodgkin di tipo B.

In accordo con l'invenzione, i linfociti T del donatore sono trasdotti con tecniche opportune con l'antigene desiderato e sono quindi arricchiti

mediante metodi di inaffinità prima di essere inie nel soggetto ricevente. In caso di insorgenza di malattia trapianto contro ospite, si somministra l'anticorpo anti-antigene al fine di inattivare i linfociti T in vivo, ad esempio per mezzo di meccanismi citotossici mediati dal complemento.

L'anticorpo sarà preferibilmente monoclonale e, ancora più preferibilmente, sarà un anticorpo monoclonale umanizzato. I dosaggi e la via di somministrazione dipenderanno da più fattori, quali condizioni, peso, sesso e età del paziente. In linea di massima, l'anticorpo sarà comunque somministrato per via endovenosa a dosi comprese tra circa 50 e circa 500 mg/m<sup>2</sup> di superficie corporea da una a tre volte al giorno fino alla pressoché totale eliminazione dei linfociti T circolanti.

L'isolamento dei linfociti T è stata descritta da Rambaldi et al., Blood, 91, 2189-2196, 1998.

I metodi di transduzione dei linfociti T con l'antigene desiderato sono noti: si veda, ad esempio la review di Verma I.M. e Somia N in Nature, 389, 239-242, 1997. Si possono impiegare, in particolare, vettori opportuni, quali ad esempio retrovirus, adenovirus, virus adenoassociati, herpesvirus, lentivirus, etc.

Ciascuno di questi vettori a sua volta comprende molti diversi tipi di organismi: se ci si limita all'esempio dei retrovirus, vi sono vettori anfotropici, ecotropici e xenotropici. Inoltre molte diverse linee cellulari di packaging sono state impiegate negli anni per ottimizzare la produzione di questi retrovirus ricombinanti e per garantirne una sempre maggiore maneggevolezza e sicurezza per gli operatori (I. M. Verma et al., Nature, 389, 239-242, 1997; M. A. Kay et al., Gene therapy, Proc. Natl. Acad. Sci.



USA, 94, 12744-12746, 1997). Di recente anche il DNA nudo è stato introdotto nelle cellule bersaglio mediante coniugazione con complessi policationici o liposomici, elettroporazione, precipitazione in cristalli salini e altre tecniche ancora. Molti diversi tipi cellulari sono stati fatti oggetto di trasferimento genico: linfociti T e B, precursori ematopoietici immaturi, cellule muscolari, fibroblasti, cellule epatiche e altri tipi cellulari ancora (I. M. Verma et al., *Nature*, 389, 239-242, 1997; M. A. Kay et al., *Gene therapy*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12744-12746, 1997).

Nel caso dell'antigene CD20, si è utilizzato un retrovirus anfortropico derivato dal Moloney murine leukemia virus e impaccato in cellule umane renali embrionarie (293T) ingegnerizzate per contenere gli elementi strutturali retrovirali su plasmidi separati (*Human Gene Therapy*, 7, 1405-1413, 1996). Tali vettori nonché i linfociti T trasformati con l'antigene esogeno, in particolare linfociti T CD20+, costituiscono un oggetto della presente invenzione.

Dopo l'evento di trasferimento genico le cellule che esprimono efficacemente il gene esogeno sono solo una minoranza della popolazione totale. Si utilizzano procedure di selezione delle cellule trasdotte utilizzando geni esogeni in grado di conferire alla cellula un vantaggio selettivo. Le cellule trasdotte possono essere selezionate anche sfruttando metodiche alternative come ad esempio il sorting al FACS con anticorpi rivolti contro molecole esogene (K. Phillips, et al., *Nature Medicine*, 2, 10, 1154-1155, 1996). Altri metodi sono costituiti da colonne di immunoaffinità o piastre da coltura preadsorbite per la procedura del "panning" etc. etc.

#### DESCRIZIONE DELLE FIGURE

**Figura 1:** schema del plasmide LTR CD20 LTR;



LTR = long terminal re; pUC = origine di replicazione; Puro = gene che conferisce resistenza alla puroimicina; PGK1 = promotore della fosfogliceraldeide kinasi; EBNA1 e OriP = elementi derivati dal virus EBV per la replicazione episomiale; AmpR = gene per la resistenza all'ampicillina.

**Figura 2:** infezione della linea CEM con CD20 e immunoselezione.

Pannello a sinistra: la linea CEM dopo infezione col virus, analizzata al citofluorimetro con un anticorpo di controllo IgG1 fluoresceinato.

Pannello centrale: la stessa popolazione analizzata con anticorpo anti CD20 fluresceinato.

Pannello a destra: la stessa popolazione dopo immunoselezione su colonne di affinità, analizzata con anticorpo anti CD20 fluoresceinato.

**Figura 3:** infezione con virus CD20 di linfociti T umani freschi

Pannello a sinistra: dopo infezione i linfociti sono marcati con anticorpi di controllo IgG2a ficoeritrinato e iGG1 fluoresceinato.

Pannello a destra: la stessa popolazione è marcata con anticorpi anti CD20 ficoeritrinato e anti CD3 fluoresceinato. Nel caso mostrato il 23% delle cellule sono doppio positive.

I seguenti Esempi illustrano l'invenzione in maggior dettaglio.

Esempio 1

Costruzione del plasmide LTR CD20 LTR

Un frammento di 913 nucleotidi del cDNA del gene del CD20 umano contenente tutta la sequenza codificante, è stato ottenuto per PCR a partire dal plasmide pCMV CD20 (Becker et al., Science, 249, 912-915, 1990).

Per l'amplificazione, 40 ng di plasmide sono stati messi in un volume finale di reazione di 100 µl costituiti da 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20

mM Tris HCl, 8.75, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA, in presenza di 0,8 µl di una soluzione 2,5 mM dNTP, 500 ng di primer "senso" (CGGGATCCAAAATGACAACACCCAGAAATTC), 500 ng di primer "antisenso" (CGGGATCCTTAAGGAGAGCTGTCATTTTCT) e 5U di Pfu DNA Polimerasi acquistata dalla ditta Stratagene (La Jolla, CA, USA). La reazione è stata condotta per 26 cicli nel termociclatore con il seguente schema; 1' a 95°C, 1' a 60°C e 2' a 72°C. Al termine della reazione sono stati aggiunti 100 µl di soluzione 25:24:1 di fenolo, cloroformio e alcool isoamilico e, dopo l'estrazione, il DNA è stato precipitato per tutta la notte a -20°C in presenza di etanolo. Dopo centrifugazione, il DNA è stato risospeso in 100 µl di acqua e quindi subclonato nel vettore pMOS (Amersham Italia S.r.l., Italia) secondo le raccomandazioni del kit commerciale "pMOS blunt ended cloning kit". Il ricombinante così ottenuto è stato amplificato e controllato per sequenza e quindi digerito con l'enzima BamHI il cui sito di riconoscimento (G/GATCC) era contenuto nelle estremità di entrambi i primers della PCR. Quindi il frammento è stato subclonato all'interno del sito BamHI del vettore retrovirale PINCO VUOTO. Il vettore retrovirale PINCO VUOTO era stato a sua volta ottenuto tramite rimozione con gli enzimi EcoRI e NotI del frammento di 1441 bp contenente il promotore del CMV (virus citomegalico) e il cDNA del gene EGFP (enhanced green fluorescent protein) a partire dal plasmide PINCO (F. Grignani et al., Cancer Res., 58, 14-19, 1998). Dopo la rimozione del frammento EcoRI-NotI, il plasmide è stato richiuso dopo appiattimento delle estremità con frammento di Klenow e chiamato PINCO VUOTO. Tale vettore retrovirale diventa quindi di 11448 bp.

Il ricombinante tra PINCO VUOTO e il cDNA di CD20 è stato

chiamato LTR-CD20-LTR ed è stato sequenziato per verificare la correttezza del subclonaggio e l'integrità del cDNA di CD20, nonché l'assenza di codoni di stop a monte dell'ATG di inizio (Fig. 1).

Il costrutto LTR-CD20-LTR è quindi costituito, per la parte che si riferisce al retrovirus, dal LTR originato dal virus della leucemia di Moloney (MoMLV), da sequenze retrovirali sempre di derivazione dal virus di Moloney, dal cDNA di CD20 nel sito BamHI e dal LTR terminale, come dettagliato nella Figura 1 che accompagna. Per il resto, invece, si tratta del plasmide PICNO (F. Grignani et al., Cancer Res., 58, 14-19, 1998) che contiene, come mostrato in figura, gli elementi EBNA-1 e OriP di derivazione del virus di Epstein Barr, l'origine della replicazione batterica (pUC) e il gene per la resistenza all'ampicillina, nonché un gene per la resistenza alla puomicina sotto il controllo del promotore PGK-1.

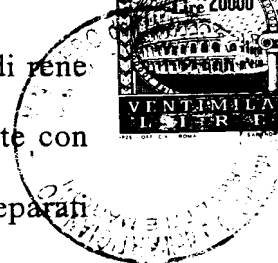
## Esempio 2

### Trasfezione del plasmide LTR-CD20-LTR nelle cellule packaging

Al fine di produrre dei retrovirus, la cellula packaging Phoenix-Ampho è stata trasfettata col plasmide LTR-CD20-LTR.

Le cellule Phoenix-Ampho sono derivate dalla linea embrionaria di rene umano 293 dopo successive modificazioni; inizialmente furono trasfettate con il gene E1A dell'adenovirus e poi trasfettate con due plasmidi separati codificanti rispettivamente per i geni strutturali gag e pol del Moloney MLV sotto il controllo del promotore del virus del sarcoma di Rous e per il gene env del Moloney MLV sotto il controllo del promotore del virus citomegalico.

$1,5 \times 10^6$  cellule sono piastrate al giorno -1 in una Petri da cultura di 10 cm di diametro in 10 ml di terreno DMEM (Gibco, Seromed, Berlino,



Germania) addizionato con 10% FCS (Hiclone Laboratories, Steril System, Logan, UK) e tenute in incubatore con CO<sub>2</sub> al 5% e 37°C. il giorno 0 vengono aggiunti 16 µl di cloroquina (soluzione madre di 25 mM in PBS) e dopo 10' viene aggiunto 1 ml di soluzione contenente 10 µg di DNA plasmidico; per ottenere questa soluzione di DNA si mettono in un tubo da 15 ml a fondo conico, 500 µl di una soluzione 2X di HBS (50 mM HEPES, pH 7.05; 10 mM KCl; 12 mM Destrosio; 280 mM NaCl; 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (FW 141.96)). Successivamente in un secondo tubo da 15 ml si prepara una soluzione di 500 µl formata da 10 µg di DNA, 61 µl di CaCl 2M e acqua sterile per portare a volume. Quindi la miscela del DNA viene aggiunta goccia a goccia nel primo tubo e il precipitato così ottenuto viene aggiunto alle cellule.

Dopo 8 ore si cambia il terreno sostituendolo con 10 ml di terreno DMEM fresco.

Il giorno +1 si sostituiscono i 10 ml di terreno con 5 ml di terreno fresco RPMI 1640 addizionato con FCS al 10%.

Il giorno +2 si procede alla infezione raccogliendo i 5 ml di terreno contenenti i retrovirus rilasciati durante la coltura.

### Esempio 3

#### Infezione con il retrovirus LTR-CD2-LTR della linea CEM

1x10<sup>6</sup> cellule della linea T linfoblastoide umana CEM in crescita in sospensione, in terreno RPMI 1640 supplementato con 10% FCS e glutammina, vengono raccolte per centrifugazione a 1200 rpm per 8', in un pozzetto a fondo piatto di una piastra da 24 pozzetti della Falcon (Becton Dickinson and Company, NY). Dopo rimozione del surnatante viene aggiunto

1 ml del surnatante viene filtrandolo attraverso filtri membranosi da  $0,45\ \mu\text{m}$  della ditta Millipore (Millipore Corporation Bedford, MA) in presenza di  $1\ \mu\text{l}$  di Polibrene (soluzione madre di  $4\ \text{mg/ml}$  in PBS).

La piastra viene quindi centrifugata per  $45'$  a  $1800\ \text{rpm}$  a temperatura ambiente e quindi il surnatante rimosso e sostituito con  $1\ \text{ml}$  di terreno fresco RPMI 16540 addizionato con  $10\%$  FCS e riportata in incubatore per  $6\ \text{ore}$ .

Al termine si ripete una seconda volta la procedura della infezione utilizzando una seconda piastra Petri di cellule packaging precedentemente preparata.

#### Esempio 4

##### Analisi al FACS delle CEM CD20+

Le cellule CEM, dopo l'infezione con il retrovirus LTR-CD20-LTR, vengono riportate in incubatore e normalmente espanse in terreno di coltura RPMI 1640 addizionato di  $10\%$  di FCS. Dopo  $2\ \text{giorni}$  le cellule CEM possono già essere valutate con analisi di immunofluorescenza per la presenza sulla superficie del marcatore CD20.

$0,1 \times 10^6$  cellule vengono trasferite in un tubo eppendorf da  $1,5\ \text{l}$ , centrifugate a  $4000\ \text{rpm}$  per  $3'$ , risospese in  $50\ \mu\text{l}$  di una soluzione di anticorpo 1F5 fluoresceinato (Becton Dickinson) anti CD20 e tenute per  $30'$  a  $4^\circ\text{C}$ . Al termine, si aggiungono  $500\ \mu\text{l}$  di una soluzione  $0,9\%$  NaCl,  $5\%$  FCS,  $0,02\%$  Na Azide e si centrifugano le cellule per  $5'$  a  $4000\ \text{rpm}$ . Al termine, il campione viene risospeso in  $100\ \mu\text{l}$  di una soluzione di PBS contenente  $1\%$  formaldeide e quindi conservato a  $4^\circ\text{C}$  fino alla lettura al citofluorimetro.

In molti esperimenti questa procedura di infezione ha prodotto sempre delle CEM CD20+ con percentuali variabili dal  $30$  al  $60\%$ , mentre la linea

non infettata completamente negativa per la espressione di CD20 (come esempio vedi la Fig. 2, pannello centrale, in cui si mostra una popolazione di cellule CEM divenuta CD20+ al 40%).

#### Esempio 5

##### Separazione per immunoaffinità

Le cellule CEM infettate col virus LTR-CD20-LTR dopo 2 giorni di coltura possono essere arricchite per la popolazione CEM CD20+ tramite colonne di immunoaffinità. A tal fine le cellule sono prima incubate per 30' a 4°C con l'anticorpo anti CD20 clone 1F54, quindi lavate tre volte con PBS e albumina umana sierica al 2,5% e al termine incubate per altri 30' a 4°C con una soluzione di microbiglie rivestite da un anticorpo di capra anti IgG murine (Miltenyi Biotech, Bergish-Gladbach, Germania).

Al termine le cellule sono risospese in terreno RPMI 1640 e selezionate mediante passaggio su colonna XS+ inserita nel SuperMACS (Miltenyi Biotech). Quindi si procede con la eluizione della colonna con fisiologica addizionata di albumina al 2,5% e all'estrazione della colonna dal SuperMACS e lavaggio per recuperare la frazione positiva.

La frazione positiva è stata quindi ulteriormente analizzata al citofluorimetro dopo marcatura delle cellule secondo la procedura di immunofluorescenza diretta precedentemente descritta.

La percentuale di CD20+ dopo questa procedura è sempre risultata superiore al 90%. Come esempio vedi la Fig. 2, pannello di destra, in cui si mostra una popolazione CEM dopo arricchimento per immunoaffinità, positiva per CD20 al 98%.

Al termine, la popolazione CEM CD20+ viene ricresciuta in

sospensione ed espansa in terreno RPMI 1640 addizionato con 10% FCS in incubatore. Ad intervalli regolari questa popolazione è stata ristudiata per l'espressione in superficie del marcatore CD30 confermando per oltre due mesi la stabilità del marcatore e la positività su oltre il 90% delle cellule selezionate.

### Esempio 6

#### Infezione col virus LTR-CD20-LTR dei linfociti T periferici freschi

Sangue totale eparinato viene stratificato su Ficoll e centrifugato per 30 min a 1500 rpm a temperatura ambiente. Le cellule raccolte all'interfaccia vengono raccolte e lavate con PBS a 1500 rpm per 10 min a temperatura ambiente, poi altre due volte a 1000 rpm per 10 min a temperatura ambiente e poi risospese in RPMI 1640 con 10%FCS a  $1 \times 10^6$ /ml in piastre da 24 pozzetti a fondo piatto deponendo 2 ml di sospensione cellulare per pozzetto in presenza di PHA (Murex) a  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$  per una notte.

Il secondo giorno si aggiunge IL-2 umana ricombinante (Proleukin, Chiron Italia, Milano) alla concentrazione finale di 100 U/ml.

Al terzo giorno, dopo lavaggio e conta cellulare, si infettano  $1 \times 10^6$  cellule in 1 ml di terreno in 1 pozzetto a fondo piatto in piastra da 24. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 10 min., il surnatante viene rimosso e sostituito con 1 ml di virus filtrato in presenza di polibrene e successiva centrifugazione per 45 min a 1800 rpm a temperatura ambiente come da protocollo sopra riportato.

Al termine, il surnatante virale viene rimosso e sostituito con terreno completo per 6 ore di incubazione e quindi la procedura della spin infection viene ripetuta. Al termine le cellule sono risospese in terreno completo in



presenza di IL-2 e lasciate riposare in incubatore per tutta la notte.

Tutta la procedura è ripetuta per i due giorni successivi e al termine le cellule vengono tenute in coltura per altri due giorni in incubatore.

Quindi le cellule vengono marcate con anticorpi monoclonali anti CD20 FITC, anti CD3 PE, anti CD4 PE e anti CD8 FITC (tutti Becton Dickinson) con la stessa procedura sopra riportata e quindi analizzati al citofluorimetro.

Molti esperimenti su donatori normali mostrano che una percentuale variabile dal 5% al 25% di linfociti T CD3+ acquisisce il marcatore CD20 in analisi di doppia fluorescenza. Uno di questi esperimenti è mostrato in Fig. 3, osservando in questo caso una doppia positività CD3/CD20 del 23%.

#### Esempio 7

#### Studio della lisi indotta dall'anticorpo e dal complemento in popolazioni di linfociti umani T freschi dopo trasduzione del gene del CD20

$2 \times 10^5$  linfociti trasdotti vengono aliquotati in provette da 10 ml a fondo tondo in 500  $\mu$ l di terreno RPMI 1650 addizionato di siero fetale di vitello scomplementato al 10%. Quindi si aggiunge l'anticorpo Rituximab® alla concentrazione finale di 350  $\mu$ g/ml e complemento di coniglio Pel freeze al 10% finale. Alternativamente, come fonte di complemento può essere aggiunto siero umano AB alla concentrazione finale del 30%. Le cellule sono lasciate per un'ora a 37°C in un bagno termostato in presenza di costante agitazione. Alla sospensione cellulare viene aggiunto un volume uguale di una soluzione 1X in fisiologica di arancio di acridina (30 mg in 100 ml di acqua distillata costituisce la soluzione madre 100 X) e la sospensione cellulare viene letta al citofluorimetro: le cellule vive emettono fluorescenza



verde e sono valutate potenzialmente sul totale della popolazione analizzata. Con questa metodica rapida abbiamo determinato la capacità di Rituximab® di uccidere le cellule CD20+, confrontando le percentuali di cellule doppio positive CD3/CD20 nelle diverse popolazioni studiate e la percentuale di cellule morte dopo aggiunta di anticorpo Rituximab®. Come si osserva dalla Tabella, le popolazioni di controllo sono costituite dalle stesse cellule esposte al solo anticorpo o al solo complemento. I dati mostrati nella tabella documentano che un'ora di esposizione a Rituximab® induce la morte di circa il 90% delle cellule CD3/CD20+.

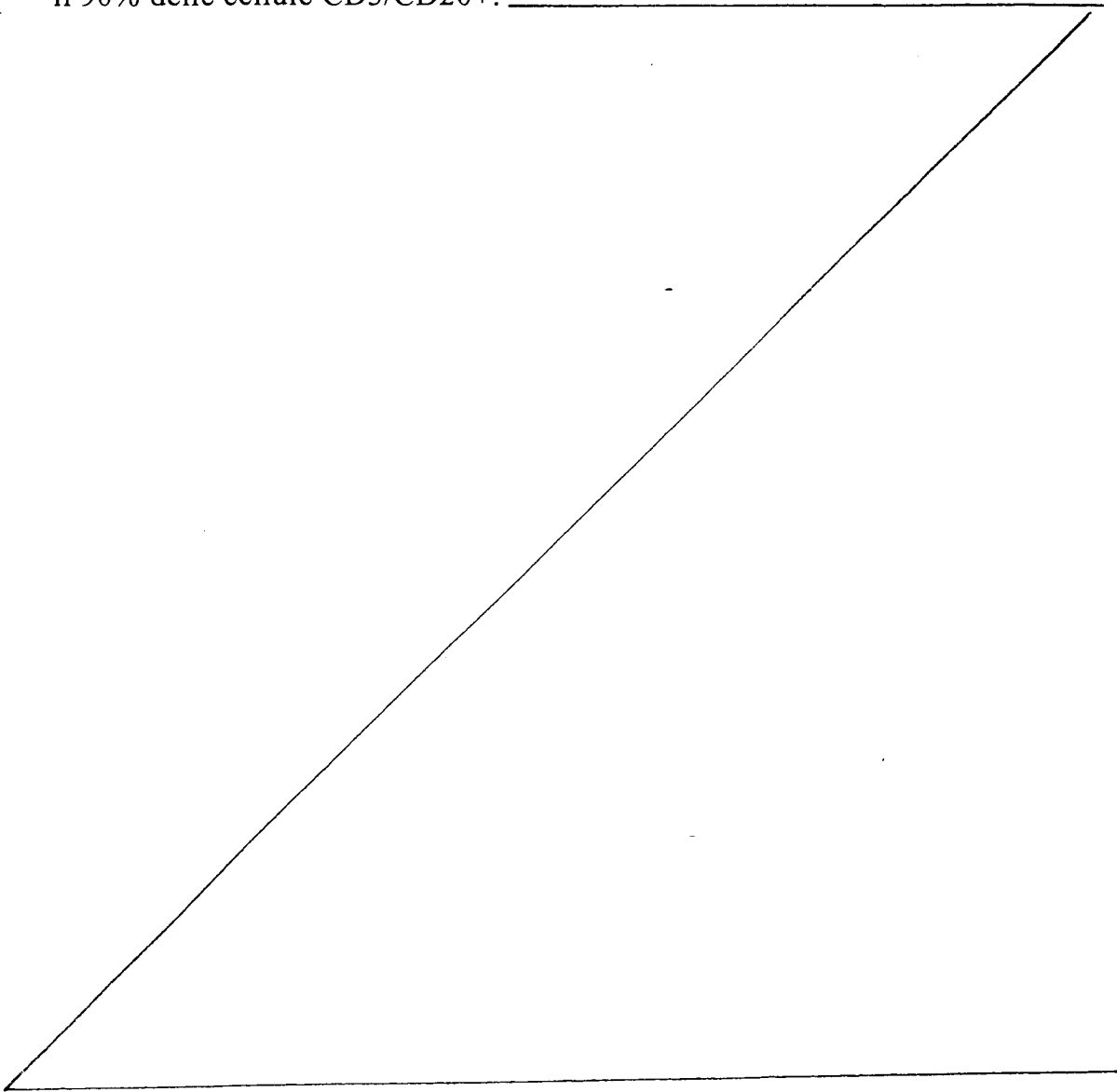
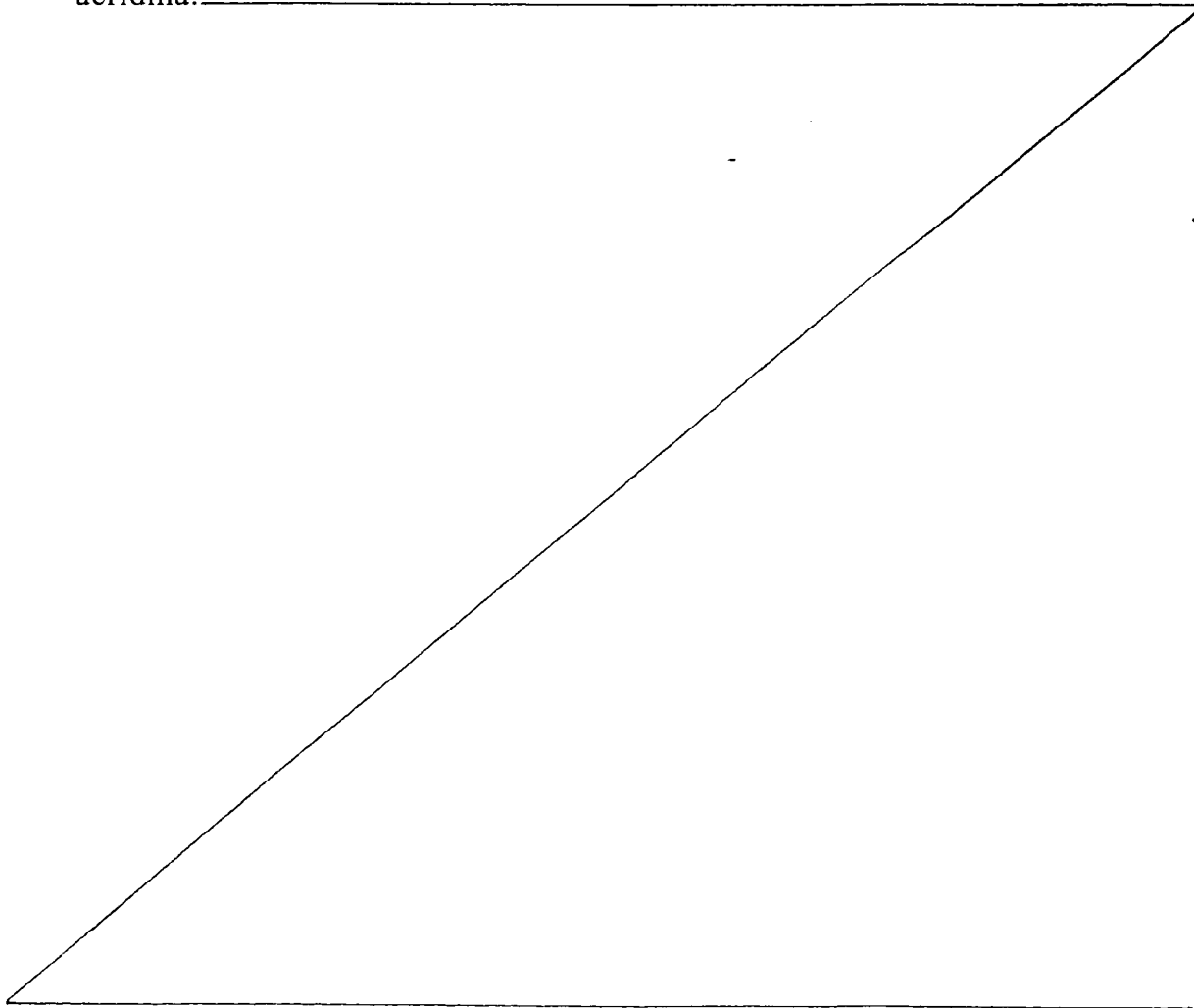


Tabella. Cytotoxicità complemento dipende dai linfociti T freschi  
umani trasdotti col gene CD20.

		% lisi specifica		
	% di linfociti CD3/CD20+	Rituximab® da solo	Complemento da solo	Rituximab® più complemento
Donatore 1	30	0	14	33
Donatore 2	23	0	11	35
Donatore 3	15	0	5	18

La percentuale di lisi è determinata al FACS dopo colorazione con  
acridina.



## RIVENDICAZIONI

1. Uso di anticorpi contro antigeni di superficie esogeni non presenti su linfociti T umani normali per la preparazione di composizioni per il trattamento della malattia trapianto contro ospite in pazienti che abbiano ricevuto linfociti T trasdotti con detti antigeni di superficie esogeni.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui si impiegano anticorpi contro l'antigene di superficie CD20 e linfociti trasdotti con l'antigene CD20.
3. Uso secondo la rivendicazione 2 in cui l'anticorpo anti-CD20 è un anticorpo monoclonale umanizzato .
4. Vettori per la trasfezione di linfociti T umani con antigeni di superficie esogeni.
5. Vettori secondo la rivendicazione 4 comprendenti il gene che codifica l'antigene CD20 umano.
6. Linfociti T umani trasdotti con antigeni di superficie esogeni.
7. Linfociti T secondo la rivendicazione 6 trasdotti con l'antigene CD20 umano.

Milano, 11 giugno 1999

Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

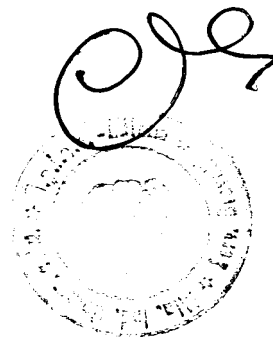
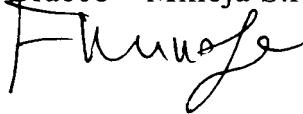
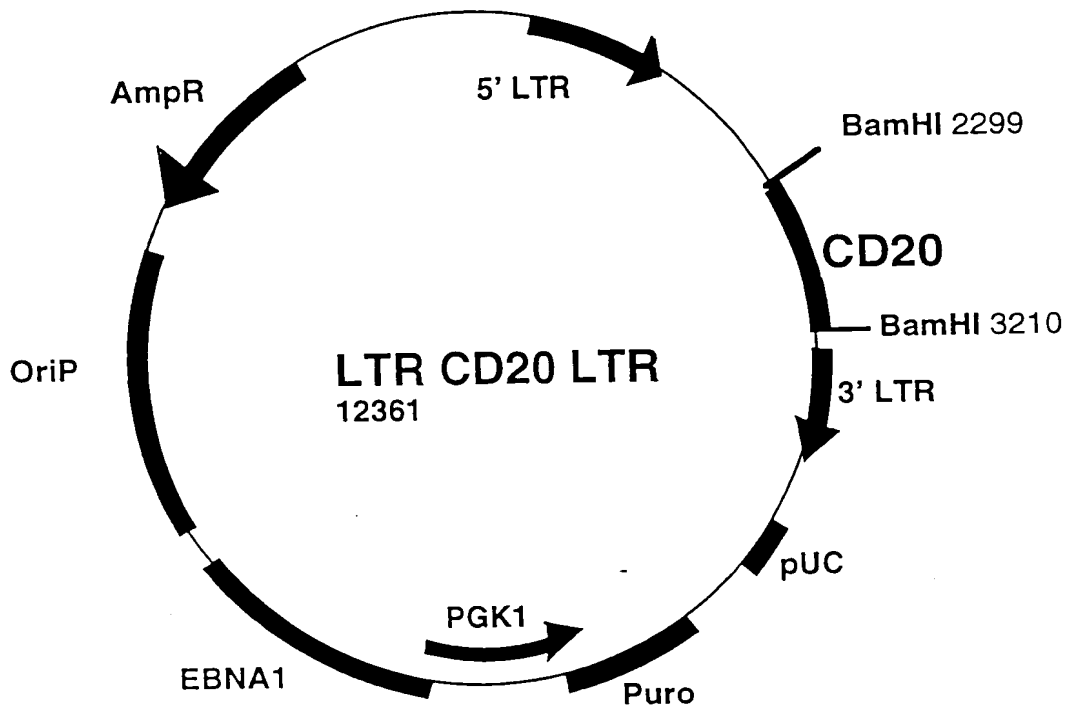


FIGURA 1

MI 99 A 001299



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

*Fabrizio*

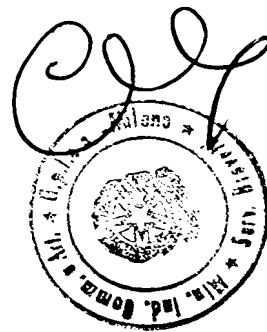
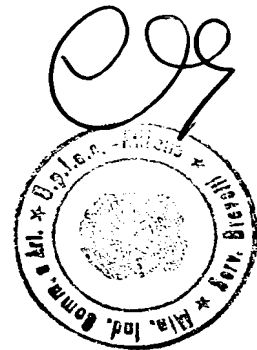
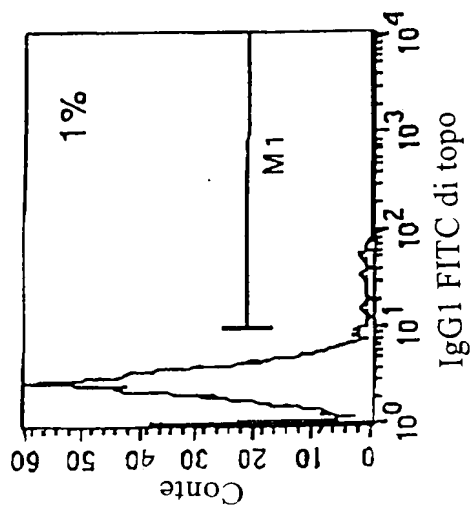
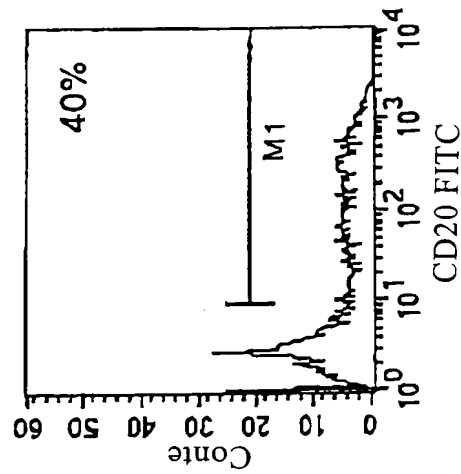
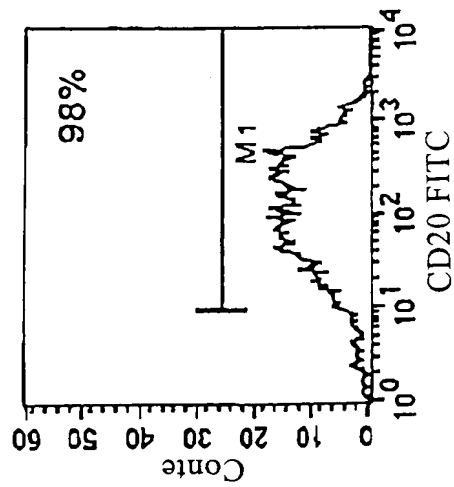


FIGURA 2

MISS A 001299

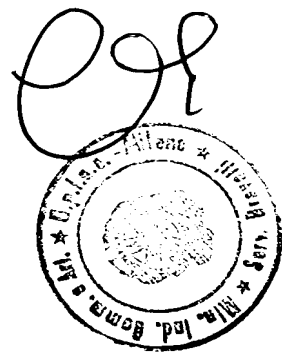
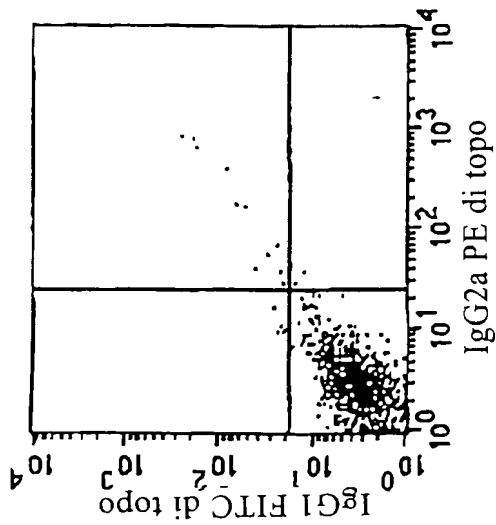
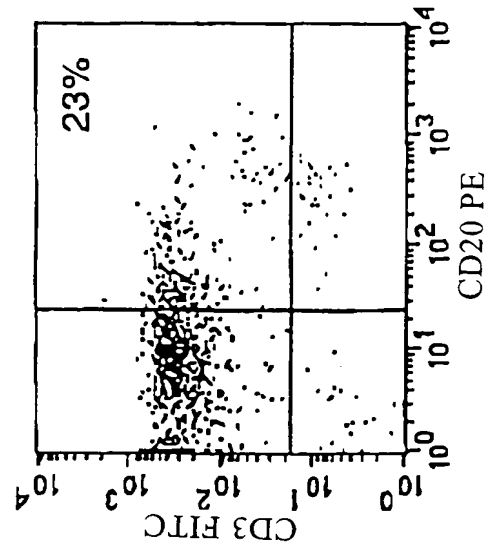


Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

*F. Minoja*

FIGURA 3

MISS A 001299



Il Mandatario  
(Minoja Fabrizio)  
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

*[Handwritten signature]*